

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PULPAS DE FRUTOS TROPICALES: APLICACIÓN DEL MÉTODO ABTS

E. Marta Kuskoski^{1,2}, Agustín G. Asuero², Ana M. Troncoso², Roseane Fett¹

¹Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rod. Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianópolis, CEP: 88034-001.

²Universidad de Sevilla, Departamento de Análisis Químico y Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, C/ García González s/n, 41012 – Sevilla, ES.

RESUMEN

El consumo de alimentos ricos en polifenoles, tales como frutos y vegetales, se traduce en una dieta particularmente beneficiosa para la salud, dada su actividad antioxidante. Para determinar la actividad antioxidante de la pulpa de frutos tropicales comercializados en Brasil, se ha utilizado el radical ABTS^{•+} formado tras la reacción del ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-sulfónico) (ABTS) con persulfato potásico. Se ha determinado la actividad antioxidante de las pulpas de frutos comerciales (mora, uva, açai, guayaba, fresa, acerola, piña, mango, graviola, cupuaçu y maracujá) y de frutos silvestres (jambolão y bagueçu). Los resultados de la actividad antioxidante global de las pulpas de frutas oscila entre mínimos de 3,4 y máximos de 67,6 µmol/g TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox), o entre 64,8 y 1198,9 mg/100g VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C) y de los extractos de frutos silvestres oscila entre 13,5 y 170,4 µmol/g TEAC, o entre 232,7 y 2923,3 mg/100g VCEAC. El orden de capacidad antioxidante determinada ha sido: acerola > mango > fresa > açai > uva > mora > guayaba > graviola > piña > maracujá > cupuaçu.

Palabras clave: pulpa de frutos, actividad antioxidante, radical ABTS.

SUMMARY

Consumption of foods rich in polyphenol, such as fruits and vegetables, may represent a beneficial diet particularly for the health, with substantial antioxidant activity. To determine the antioxidant activity of fruit pulps consumed in Brazil, a reaction of 2,2'azinobis-(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid) (ABTS) with potassium persulfate to generate the radical ABTS^{•+} has been performed in our laboratory. In this sense, the antioxidant activity of the fruits pulps was determined (mulberry, grape, açai, guava, strawberry, acerola, pineapple, mango, graviola, cupuaçu and maracujá) and the fruits (jambolão and bagueçu). The results of the global antioxidant activity of the fruit pulps is ranging from 3,4 to 67,6 µmol/g of TEAC (antioxidant activity equivalent to Trolox), or from 64,8 to 1198,9 mg/100g of VCEAC (antioxidant activity equivalent to vitamin C) for the commercial products, and from 13,5 to 170,4 µmol/g TEAC, or from 232,7 to 2923,3 mg/100g VCEAC for the extracts of wild fruits. The found antioxidant activity is in the order: acerola > mango > strawberry > açai > grape > mulberry > guava > graviola > pineapple > maracuja > cupuaçu.

Keywords: fruit pulps, antioxidant activity, method ABTS.

INTRODUCCIÓN

Existe una creciente demanda de zumos y pulpas de frutos tropicales, principalmente de piña, maracujá, mango, guayaba y acerola, los más conocidos en el mercado internacional, aunque muchas veces predominan también las mezclas de frutas tropicales. Recientemente se ha producido un incremento en la utilización de pulpa de frutas tropicales en las industrias lácteas, heladerías, repostería, etc., implicando esto un interés adicional en las exportaciones.

Los frutos aportan diversos componentes nutrientes esenciales y una serie de micronutrientes tales como minerales,

fibras y vitaminas, así como metabolitos secundarios de naturaleza fenólica, denominados polifenoles (1, 2). Las plantas conteniendo polifenoles han sido motivo de interés para los investigadores durante décadas, en un principio debido su importancia fisiológica en la planta, principalmente en lo que respecta a la pigmentación y sabor, y en la actualidad debido su capacidad antioxidante. Los compuestos fitoquímicos, principalmente los flavanoles, flavonoles y antocianos contienen grupos hidroxilos enlazados al anillo bencénico, que confieren la capacidad de captar radicales libres y aumentar la actividad antioxidante, entre otros efectos biológicos (3-7).

La comprensión científica de como estos componentes no nutricionales o

fitoquímicos actúan en el organismo apenas está en sus inicios; no solo se ha comprobado la existencia de centenares de ellos, sino que también se está logrando establecer la forma de acción, en algunos casos. Estudios realizados con compuestos polifenólicos y especialmente los flavonoides demuestran su capacidad antioxidante y su significativa contribución en la dieta, así como su efecto en la prevención de diversas enfermedades tales como: enfermedades cardiovasculares, cancerígenas y enfermedades neurológicas (5, 8-11).

Debido al aumento de la comercialización y consumo de frutos tropicales en el mercado y su creciente indicación como fuente rica en antioxidantes, el presente trabajo tiene como objeto

determinar y comparar la relación entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles y antocianos en pulpas de frutos comercializados en sur de Brasil tales como mora (*Morus nigra*), uva (*Vitis vinifera*), açai (*Euterpe oleracea* Mart.), goiaba (*Psidium guajava*), fresa (*Fragaria vesca* var.), acerola (*Malpighia glabra* Linn.), piña (*Ananas comosus* L.), mango (*Mangifera indica* L.), graviola (*Annona muricata* L.), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), maracuyá (*Passiflora* sp) así como baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg) y jambolão o ciruelo de java (*Eugenia jambolana* Lam), aplicando el método químico ABTS (12).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Se ha utilizado Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico 97%, Aldrich Chemical Co., Gillingham, Dorset, UK) como antioxidante de referencia. Las pulpas de frutas 100% natural de marca comercial MaisFruta®, congeladas obtenidas al azar a partir de embalajes de 100 g se conservan congeladas a -15°C, y se diluyen con agua Milli-Q según la indicación del fabricante (100 g/250 mL) y centrifugan. Los extractos de las pulpas de los frutos silvestres baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg) y jambolão (*Eugenia jambolana* Lam) se obtienen por maceración con 0,1% de HCl en etanol y metanol. El ABTS, ácido 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin 6-sulfónico) en forma de sal diamónica y el persulfato potásico (ultrapuro) proceden de Sigma Aldrich (Poole, Dorset, UK). Todos los ensayos se efectúan en un Espectrofotómetro modelo HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK) con celda de temperatura controlada.

Determinación de antocianos totales: Método por diferencia de pH

Como método alternativo para la determinación estimativa del contenido de antocianos totales se tiene el método por diferencia de pH (13) en el que se utilizan dos disoluciones reguladoras:

ácido clorhídrico/cloruro de potasio de pH 1,0 (0,025 M) y ácido acético/acetato sódico de pH 4,5 (0,4 M). A 0,2 mL de una muestra diluida (para conseguir una absorbancia en el rango de 0,100-1,200 a 510 nm) se añaden 1,8 mL de la correspondiente disolución tampón y se mide frente a un blanco a 510 nm y 700 nm. La absorbancia se calcula a partir de:

$$A = (A_{\text{max. vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{\text{max. vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}$$

La concentración de pigmentos monoméricos en el extracto se calcula y expresa en cianidina-3-glucósido. Antocianos monoméricos (mg/100g) =

$$\frac{A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 100}{(\epsilon \times 1)}$$

A = Absorbancia;

PM = peso molecular

FD = Factor de dilución (250);

ϵ = absorptividad molar

La concentración final de antocianos (mg/100g) se calcula en base al volumen de extracto y peso de muestra. Se expresa en cianidina 3-glucósido (PM: 449,2 y ϵ : 26900).

Índice de polifenoles totales (IPT)

El método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu (14) para determinar polifenoles totales se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originándose óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico/100g de frutos frescos.

Actividad antioxidante: Método ABTS

Se aplica la metodología desarrollada por Re y col., (12) con modificaciones realizadas por Kusoski y col. (15). El radical ABTS^{•+} se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluye con

etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0,700 ± 0,1 a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción, $\lambda_{\text{máx}}$). Las muestras se diluyen hasta que se obtiene un 20-80% de inhibición en comparación con la absorbancia del blanco tras añadir 20 mL de la muestra. A 980 mL de dilución del radical ABTS^{•+} así generado se le determina la A_{754} a 30°C, se añade 20 mL de la muestra y se mide de nuevo a A_{754} pasado 1 minuto. La absorbancia se registra de forma continua hasta los 7 minutos. El antioxidante sintético Trolox de referencia a una concentración de 0-15 mM (concentración final) en etanol, se ensaya en las mismas condiciones, lo que se hace también con ácido ascórbico (0-20 mg/100mL). Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antocianos totales e índice de polifenoles

El contenido total de antocianos y de polifenoles encontrados se muestra en la Tabla 1. La cantidad de antocianos totales en las pulpas de mora, uva, fresa, açai y acerola es de 41,8; 30,9; 23,7; 22,8 y 16,0 mg/100g peso fresco, respectivamente. Mora y uva presentan los mayores contenidos de antocianos mientras que acerola y guayaba son las pulpas que los contienen en menor cantidad; piña, mango, graviola, cupuaçu y maracuyá carecen de los mismos. En los extractos de frutos silvestres de baguaçu y jambolão las mayores cantidades de antocianos totales se encuentran en los extractos obtenidos con etanol; valores de 596,4 y 111,2 mg/100g respectivamente. El contenido total de flavonoides, antocianos y compuestos fenólicos no flavonoides determinados por el índice de polifenoles totales también se muestran en la Tabla 1. Los extractos de la pulpa baguaçu contienen un elevado índice de polifenoles totales (897,6 mg/100g), seguidos de la pulpa de acerola (580,1 mg/100g), de mango (544,9 mg/100g), de los extractos de

pulpa de jambolão (229,6 mg/100g), de pulpa de açaí (136,8 mg/100g) y fresa (132,1 mg/100g) que son similares a los de mora (118,9 mg/100g) y uva (117,1 mg/100g). Los valores de polifenoles totales son elevados, si se considera que son muestras de pulpas congeladas y, si se compara con los valores obtenidos por otros investigadores en frutos frescos, tales como fresa (160,0 ± 1,2 mg/100g) y uva roja (201,0 ± 2,9 mg/100g) de acuerdo con Sun y col., (2002).

Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de compuestos captadores de radicales libres de ABTS^{•+} equivalente a Trolox es denominada TEAC. Varios compuestos químicos, incluyendo los flavonoides, fenilpropanoides y ácidos fenólicos son conocidos como responsables de la capacidad antioxidante de los frutos y vegetales (16, 17). De todas las mues-

tras ensayadas (pulpas y extractos), los valores TEAC encontrados varían entre máximos y mínimos de 170,4 y 1,8 μmol/g. La media de los mayores valores de TEAC encontrados es de 170,4; 18,1; 67,6 y 13,1 μmol/g para los extractos de baguaçu, jambolão, pulpa de acerola y pulpa de mango, respectivamente.

Elevados valores de IPT se reflejan en altos valores de TEAC (18). La correlación entre el TEAC y el índice de polifenoles totales o el contenido total de antocianos de extractos de frutos silvestres (bagaçu y jambolão) se representa en la Figura 1. La media de los valores de TEAC se correlaciona de forma positiva con la media de los valores de antocianos totales y polifenoles totales. Se observa una respuesta lineal entre el TEAC y polifenoles totales o antocianos. El coeficiente r^2 , es de 0,99 para los polifenoles totales y 0,95 para los antocianos totales. Estos valores indican que la capacidad antioxidante

se encuentra relacionada con los polifenoles totales y con los antocianos.

Los valores de actividad antioxidante también se expresan en equivalentes a vitamina C (VCEAC). Se justifica expresarlo de esta manera dado que las muestras ensayadas son alimentos, y la vitamina C es un nutriente que se encuentra diariamente en nuestra dieta (19). No obstante, la capacidad antioxidante de los frutos está más bien relacionada con la combinación de los compuestos fitoquímicos. Según Eberhardt y colaboradores (20) la vitamina C contribuye en un 0,4% de la actividad antioxidante total de las manzanas. En un experimento realizado con 11 tipos de frutos, Sun y colaboradores (21), demuestran que frutos ricos en vitamina C (pomelo, naranja, limón, etc.) apenas contribuyen a la actividad antioxidante, mientras que frutos como arándanos agrio que no contienen vitamina C, presentan la mayor actividad antioxidante de todos (177 μmol de vitamina C/g fruto fresco).

Tabla 1. Determinación de antocianos totales (AT), índice de polifenoles totales (IPT) y TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) de pulpa de frutos tropicales por el método ABTS (media ± DE, $n=3$)

Muestras	IPT (mg/100g)	AT ^a (mg/100g)	TEAC ^b (μmol/g)	VCEAC ^c (mg/100g)
pulpa baguaçu ¹	897,6 ± 5,1	596,4 ± 30,8	170,4 ± 0,3	2923,3 ± 5,2
pulpa baguaçu ²	704,8 ± 27,2	577,7 ± 24,2	134,4 ± 1,9	2386,1 ± 12,3
pulpa de jambolão ³	229,6 ± 13,6	111,2 ± 4,1	18,1 ± 1,1	309,5 ± 18,7
pulpa de jambolão ⁴	194,7 ± 3,5	108,8 ± 8,0	13,5 ± 0,1	232,7 ± 1,0
pulpa de mora	118,9 ± 2,1	41,8 ± 1,8	7,1 ± 0,2	125,8 ± 3,2
pulpa de uva	117,1 ± 0,6	30,9 ± 0,1	9,3 ± 0,2	161,5 ± 3,3
pulpa de açaí	136,8 ± 0,4	22,8 ± 0,8	9,4 ± 0,2	163,4 ± 4,0
pulpa de guayaba	83,0 ± 1,3	2,7 ± 0,2	6,8 ± 0,3	120,0 ± 4,5
pulpa de fresa	132,1 ± 3,8	23,7 ± 2,3	11,7 ± 0,0	202,5 ± 0,5
pulpa de acerola	580,1 ± 4,6	16,0 ± 0,5	67,6 ± 0,5	1198,9 ± 8,1
pulpa de piña	21,7 ± 4,5	nd	3,4 ± 0,3	64,8 ± 5,2
pulpa de mango	544,9 ± 7,3	nd	13,1 ± 0,3	224,7 ± 4,6
pulpa de graviola	84,3 ± 5,8	nd	4,2 ± 0,2	76,8 ± 4,0
pulpa de cupuaçu	20,5 ± 3,0	nd	1,8 ± 0,0	37,0 ± 0,0
pulpa de maracuyá	20,0 ± 2,6	nd	2,8 ± 0,1	54,0 ± 1,9

^a datos espectrofotométricos.

^b TEAC: actividad antioxidante equivalente al Trolox en 6 min.

^c VCEAC: actividad antioxidante equivalente a vitamina C en mg/100g. Nd: no detectada. Muestras:

¹ (pulpa de baguaçu extraída con EtOH) ²(pulpa de baguaçu extraída con MeOH) ³(pulpa de jambolão extraída con EtOH) ⁴(pulpa de jambolão extraída con MeOH).

En la pulpa de los frutos mango y graviola no se detecta antocianos y se sugiere que la mayoría de la actividad del antioxidante se atribuye a la combinación de otros compuestos fitoquímicos en frutas, relacionándose básicamente con el contenido de polifenoles totales.

CONCLUSIÓN

Los frutos de baguaçu y jambolão son ricos en polifenoles totales, principalmente antocianos y en consecuencia muestran una elevada actividad antioxidante, obteniéndose los mayores valores en los extractos con etanol. Aunque congeladas, las pulpas de frutos tropicales comercializadas en el sur de Brasil presentan significativos valores antioxidantes, destacándose las de acerola y mango. Se observa una respuesta lineal entre los valores TEAC y los valores de antocianos y polifenoles totales, indicando correlación entre ellos. En algunas pulpas de frutos los valores de antocianos son bajos o inexistentes, atribuyéndose la actividad antioxidante a los restantes compuestos fitoquímicos.

Bibliografía

1.- Harborne, J.B.; Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 52, 481-504.

2.- Wang, H.; Provan, G.J.; Helliwell, K. (2000). Tea flavonoides: their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Scien. Technol.* 11, 152-160.

3.- Stavric, B. (1994). Role of chemopreventers in human diet. *Clinical Biochemistry*. 27, 5, 319-332.

4.- Ishige, K.; Schubert, D.; Sagara, Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Rad. Biol. Med.* 30, 433-446.

5.- Sánchez-Moreno, C. (2002) Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. *Actividad antioxidante. Alimentaria.* ene-feb, 29-40.

6.- Ross, J.A.; Kasum, C.M. (2002). Dietary Flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 19-34.

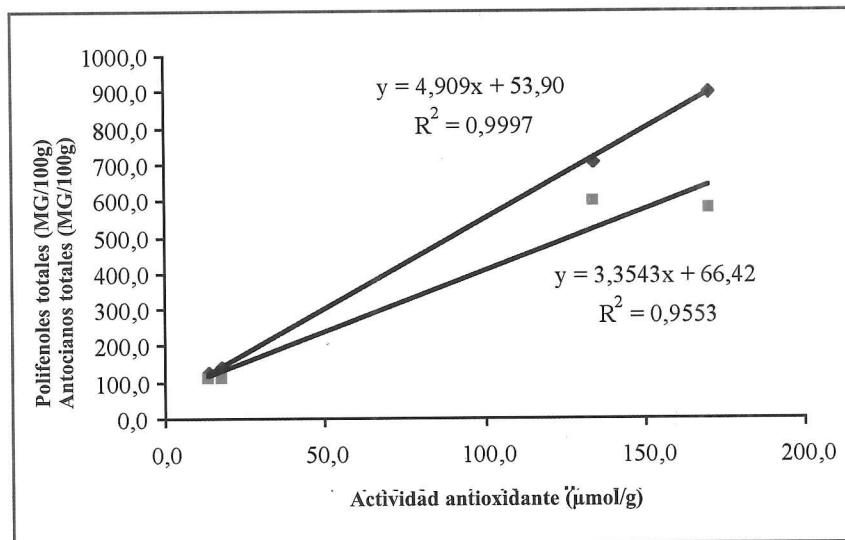


Figura 1. Correlación entre polifenoles totales ($r^2 = 0,99$) y antocianos totales ($r^2 = 0,95$) para el valor de TEAC ($\mu\text{mol/g}$) de los extractos de frutos silvestres.

7.- Moyer, R. A.; Hummer, K. E.; Finn, C.E.; Frei, B.; Wrolstad, R.E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidants capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 519-525.

8.- Schramm, D.D.; German, J.B. (1998). Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *J. Nutr. Biochem.* 9, 560-566.

9.- Vinson, J.A.; Teufel, K.; Wu, N. (2001). Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis*, 156, 67-72.

10.- Stoclet, J.C.; Chataigneau, T.; Ndiaye, M.; Oak, M.H.; Bedoui, J.E.; Chataigneau, M.; Schini-Kerth, V.B. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur. J. Pharm.* 500, 299-313.

11.- Heo, H.J.; Lee, C.Y. (2005). Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1984-1989.

12.- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 1231-1237.

13.- Giusti, M.M.; Wrolstad, R. E. (2001). Unit. F1.2.1-13. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible Spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Wrolstad, R.E., E.; John Wiley & Sons: New York, 2001.

14.- Folin, C.; Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J. Biol. Chem.* 73, 627-650.

15.- Kuskoski, E.M.; Asuero, A.G.; Troncoso, A.M.; Garcia-Parilla, M. C.; Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Rev. Bras. Cienc.Tecn. Alim.*, 24, 4, 691-693.

16.- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Papaganda, G. (1996). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20, 933-956.

17.- Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13, 572-584.

18.- Sellappan, S.; Akoh, C.C.; Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2432-2438.

19.- Kim, D-O.; Lee, K.W.; Lee, H.J.; Lee, C.Y. (2002). Vitamina C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3713-3717.

20.- Eberhardt, M.V.; Lee, C.Y.; Liu, R.H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405, 903-904.

21.- Sun, J.; Chu, Y.F.; Wu, X.; Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7449-7454.